

# Acción del aceite ozonizado sobre la cicatrización de heridas de piel en animales de experimentación

Alejandro Sánchez Anta, Pedro Díaz Rojas, Gloria Rodríguez González, Elizabeth Leyva Sánchez, Elena Díaz Santos\* y Luis Borrego Pino.\*\*

Facultad de Ciencias Médicas, \*Centro de Retinosis Pigmentaria, Hospital Provincial Docente "V. I. Lenin" y \*\*Hospital Provincial Docente "V. I. Lenin", Holguín, Cuba.

Recibido: 25 de noviembre de 1997. Aceptado: 20 de diciembre de 1997.

Palabras clave: Aceite ozonizado, ozono, tejido conectivo, tejido epitelial, cicatrización.  
Key words: ozonized oil, ozone, connective tissue, epithelial tissue, healing process.

**RESUMEN.** Por las ventajas reportadas con la ozonoterapia y la importancia de desarrollar investigaciones preclínicas que contribuyan a esclarecer sus mecanismos de acción, se realizó un estudio de la acción del aceite de girasol ozonizado (OLEOZON) sobre la cicatrización de heridas de piel en 60 ratones isogénicos machos, adultos, línea Balc-C. A cada animal se le produjo una herida perforante de aproximadamente 1 mm de diámetro, mediante un trócar, en la zona central de ambos pabellones auriculares. Posteriormente, se dividieron en dos grupos de 30 cada uno: Grupo Control, a cuyos animales se les aplicó localmente aceite de girasol en la herida, diariamente durante 7 d y Grupo Ozono, a cuyos animales se les aplicó de igual forma OLEOZON. Se sacrificaron tres animales de cada grupo a las 24 h y a los 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 y 32 d. Se realizaron mediciones del diámetro y el área de la herida, utilizando para ello el sistema Morfométrico con empleo de la computación COMSDI-PLUS. Las muestras se incluyeron en parafina y se colorearon con hematoxilina y eosina para realizar estudio histológico sobre el desarrollo de las fases del proceso. Se observó que la utilización del OLEOZON en la cura local de heridas de piel, no modifica la secuencia general de los fenómenos que se producen durante la cicatrización de dichas lesiones y los indicadores evaluados tuvieron valores inferiores en el grupo tratado con ese producto, lo que habla de su acción favorecedora de la cicatrización.

**ABSTRACT.** Due to the advantages reported with ozone therapy and the importance of carrying out preclinical investigations which contribute to make clear its action mechanism, a study of the action of ozonized sunflower oil (OLEOZON) on the healing of skin wounds in 60 adult isogenic line Balc-C male mice was performed. A piercing wound of about 1 mm in diameter in the central ozone of both auricular chambers was made to each animal. The animals were divided into two groups. Control group: sunflower oil was applied daily in the wound for 7 d; and Ozone group: OLEOZON was applied daily in the wound. Three animals from each group were killed within the next 24 h and in days 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 and 32. Measurements of the diameter and superficial area wound were taken on each animal once it was killed using the morphometric computing system as well as COMSDI-PLUS. The samples were processed later with paraffine technique and were dyed with hematoxilline and eosine to carry out the histological study concerning the development of the phases of the healing process. Results show that OLEOZON used for the local cure of skin wound does not modify the general sequence of phenomena produced during the healing of those lesions, and the measurements taken had lower values in the group cured with this product, which speaks by itself of its action favoring healing.

## INTRODUCCION

Las primeras aplicaciones del ozono con fines socialmente útiles se remontan a finales del siglo pasado, cuando se desarrollaron trabajos para el tratamiento de aguas, atendiendo a la alta capacidad desinfectante que este gas posee.

En el campo de la Medicina, se utilizó por primera vez con fines terapéuticos, para la curación de heridas y fisuras, durante la Primera Guerra Mundial.<sup>1</sup> A pesar de haber tenido hasta el momento diversos usos, existen proporcionalmente pocos estudios de las bases biológicas de la ozonoterapia, lo cual ha causado que la experiencia clínica al respecto, aunque vasta, se ha mantenido limitada.<sup>2</sup>

Se ha postulado que los mecanismos de acción del ozono están relacionados con la generación de productos secundarios en su selectiva interacción con los dobles enlaces carbono-carbono de los compuestos orgánicos que se encuentran presentes en el plasma y en las membranas celulares.<sup>3</sup> Como los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran en un elevado porcentaje en los fluidos y estructuras celulares del organismo, la reacción del ozono con éstos genera peróxidos orgánicos y ozónidos.<sup>4</sup> Los cuales en cantidades adecuadas y controladas ejercen acciones biológicas que le confieren al ozono un conjunto de propiedades

### Correspondence:

Dr. Luis Borrego Pino, Calle 20 de Mayo, No. 2, esquina a General García, Reparto Santiesteban, Holguín, Cuba.

terapéuticas, entre las que se destacan: mejora del metabolismo del oxígeno, modulación del estrés oxidativo biológico, intervención en la liberación de autacoides, modulación inmunológica, regulación metabólica y acción germicida de amplio espectro.<sup>5,6</sup>

Este análisis, unido a la valoración de las etapas del proceso de cicatrización de heridas y a los mecanismos, tanto inmunológicos como de división celular involucrados en cada una de dichas etapas fundamenta la posibilidad de una acción favorecedora del ozono sobre los procesos de reparación tisular en heridas.

Cuba cuenta con un programa nacional de ozonoterapia, jerarquizado por el Centro de Investigaciones del Ozono y entre sus objetivos está elevar la calidad de este procedimiento médico y desarrollar investigaciones que respondan a problemas importantes de la Medicina y que puedan resolverse mediante la aplicación de la terapéutica con ozono.<sup>7</sup>

Esto, unido a la necesidad de desarrollar investigaciones preclínicas que contribuyan a esclarecer los mecanismos de acción del ozono en sus diferentes usos médicos, fundamenta el interés en realizar un estudio acerca de la acción que tiene el aceite de girasol ozonizado (OLEOZON, Centro de Investigaciones del Ozono, Ciudad de La Habana), sobre el proceso de cicatrización de heridas de piel en animales de experimentación y sobre el cual se han reportado buenos resultados en diferentes usos.<sup>8-11</sup>

### MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio preclínico experimental en 60 ratones isogénicos machos, adultos, línea Balc-C y con peso entre los 25 y 30 g .

A las 6:00 pm a cada animal se le produjo una herida perforante con pérdida de tejidos de aproximadamente 1 mm de diámetro, mediante un trócar, en la zona central de ambos pabellones auriculares.

Los animales fueron divididos en dos grupos, de 30 ratones cada uno:

**Grupo Control:** Se le aplicó localmente en al herida aceite de girasol, diariamente durante 7 d .

**Grupo Ozono:** Se le aplicó de igual forma OLEOZON (aceite de girasol ozonizado) localmente a nivel de la herida durante el mismo tiempo.

Se sacrificaron tres animales de cada grupo a las 24 h y a los 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, y 32 d .

Se realizaron mediciones del diámetro y del área de la herida en cada

animal una vez sacrificado, utilizando para ello microscopio estereoscópico y el sistema morfométrico con el empleo de la computación (COMSDI -PLUS).

Para el cálculo del diámetro y del área se hicieron en cada animal cinco mediciones de cada indicador y se promediaron posteriormente los resultados. Igualmente se procedió con los tres animales sacrificados del mismo grupo en cada uno de los momentos de la serie cronológica referida para la toma de muestra.

Las muestras se procesaron posteriormente por la técnica de la parafina y se hicieron cortes seriados, longitudinales de la región de la herida del pabellón auricular derecho con un grosor aproximado entre 7 y 8  $\mu$ m . Las muestras fueron coloreadas con hematoxilina y eosina.

Se realizó estudio cualitativo de las láminas histológicas, en el que se valoró el desarrollo de las fases del proceso de cicatrización.

### RESULTADOS Y DISCUSION

Se comprobó que en el grupo de animales cuyas heridas fueron tratadas con OLEOZON, los valores de ambos indicadores morfométricos (diámetro de la perforación y el cálculo de su área) fueron inferiores a partir de las 72 h (con excepción de la muestra tomada a los 21 d de la lesión). El valor medio del diámetro de ésta durante el tiempo del experimento fue de 1,45 mm para el grupo Control y de 1,23 mm para el grupo tratado con OLEOZON (Tabla 1).

**Tabla 1.** Diámetro promedio de las heridas en los animales de ambos grupos.

Tiempo (d)	Grupo	
	Control	OLEOZON
	Diámetro promedio (mm)	
1	1,51	1,56
2	1,58	1,65
3	1,58	1,42
5	1,97	1,18
7	1,82	1,30
10	1,66	1,42
14	1,09	0,88
21	1,04	1,27
28	1,04	0,91
32	1,20	0,74
$\bar{X}$	1,45	1,23

Al calcular el área promedio de la perforación realizada en el pabellón auricular, para el total de días de la experiencia, se obtuvo un valor medio para el el grupo Control de 1,65 mm<sup>2</sup>, mientras que para el grupo OLEOZON de 1,18 mm<sup>2</sup> (Tabla 2).

**Tabla 2.** Area promedio de las heridas en los animales de ambos grupos.

Tiempo (d)	Grupo	
	Control	OLEOZON
	Area promedio (mm <sup>2</sup> )	
1	1,77	1,92
2	1,96	1,77
3	1,95	1,10
5	2,73	1,18
7	2,40	1,33
10	2,11	1,27
14	0,88	0,52
21	0,85	1,27
28	0,76	0,64
32	1,09	0,40
$\bar{X}$	1,65	1,18

A las 24 h se observó en el tejido de todo el pabellón auricular la aparición de congestión vascular, dada por la presencia de vasos sanguíneos con gran cantidad de hematíes y(o) leucocitos en su interior, así como por cambios en las características de las células endoteliales, pues sus núcleos se tornaron ovales y de coloración más clara que la habitual de una célula endotelial en reposo.

De igual forma, a las 24 h, en los dos grupos de estudio se observaron abundantes leucocitos polimorfonucleares en los vasos sanguíneos y en el tejido conectivo adyacente a la zona de la herida, sitio donde alcanzaron grandes proporciones desde las 24 h y hasta los 10 d, después de lo cual disminuyeron aunque manteniéndose en menores proporciones en la zona proximal a la herida durante todo el resto del tiempo estudiado. Se observó que los leucocitos migraron en grandes cantidades hacia los bordes de la herida para organizar a este nivel la barrera leucocitaria defensiva que también, se pudo apreciar en los animales sacrificados a la 24 h, la que se mantuvo posteriormente hasta desprenderse junto con la costra, lo cual ocurrió alrededor de los 5 d en ambos grupos.

Un comportamiento similar a los polimorfonucleares, aunque en un tiempo posterior, tuvieron los leucocitos mononucleares.

Es importante destacar que la intensidad de la reacción inflamatoria a nivel de los tejidos adyacentes a la lesión, dado por la concentración de leucocitos en el tejido, fue superior en los animales del grupo curado con OLEOZON, en comparación con el grupo control.

Inicialmente, se observó en los dos grupos que algunas células epidérmicas adyacentes al borde de la herida sufrieron degeneración, pero ya a las 48 h se pudo apreciar claramente el proceso de re-epitelización de los bordes de la herida. El proceso fue avanzando desde ambas superficies lesionadas hacia la zona central del pabellón auricular ocupada por el cartílago, hasta que alrededor de las 72 h ya había ocurrido la fusión de ambos brotes epiteliales; en los animales tanto del grupo control como los tratados con OLEOZON.

Al mismo tiempo que ocurría la fusión de los brotes epiteliales, el epitelio de nueva formación de las dos superficies, que inicialmente poseía una sola capa de células se fue estratificando, apareciendo ya a las 72 h en los dos grupos. Se observó una capa superficial de células aplanadas en las cuales se comenzaron a apreciar gránulos a partir del quinto día. Aproximadamente a las 48 h comenzó a observarse la queratina en la superficie del epitelio, que cubrió el borde de la herida en ambas superficies. Inicialmente la queratina resultó inmadura o para-queratina, pero ya a los 10 d para los dos grupos era madura u ortoqueratina.

El tejido epitelial de nueva formación a nivel del borde de la herida, aumentó progresivamente de grosor, superando en ambos grupos el del epitelio característico del tejido no lesionado. Llama la atención que el engrosamiento del epitelio, tanto del borde de la herida, como en las zonas adyacentes fue mayor en el grupo tratado con OLEOZON en comparación con el grupo Control, aunque en etapas posteriores dicha característica epitelial recupera normalidad.

Simultáneamente con los aspectos descritos sobre el desarrollo del proceso inflamatorio inicial de la cicatrización y a la reparación epitelial, en el tejido conectivo ocurren cambios importantes. Inicialmente, desde las 24 h, se aprecia en los dos grupos una disminución considerable

de la intensidad de coloración de dicho tejido, esto representa fundamentalmente la dispersión de la sustancia intercelular por el aumento de la cantidad de líquido en los espacios extracelulares (edema). Posteriormente, después del séptimo día, en ese tejido conectivo comienza a aumentar en forma considerable la cantidad de células fibroblásticas, cuyos núcleos inicialmente se observan dispuestos desordenadamente, pero luego se orientan en sentido longitudinal a la superficie epitelial. A partir del décimo día, tanto en el grupo Control como en el curado con OLEOZON, comienza a avanzar nuevo tejido conectivo desarrollado entre la línea de sección del cartílago y el epitelio de nueva formación en el borde de la herida. A los 21 d de evolución de la herida, en ambos grupos se aprecia crecimiento del tejido cartilaginoso seccionado en la herida.

Los resultados permitieron afirmar que la utilización del OLEOZON para la cura local de heridas de piel, no modifica la secuencia general de los fenómenos que se producen durante la cicatrización de dichas lesiones.

Con relación al proceso inflamatorio inicial de la cicatrización se pudo apreciar, al comparar lo ocurrido en los dos grupos estudiados, que no se modificó en cuanto a secuencia de acontecimientos, sin embargo, en cuanto a la intensidad, fue superior en los tejidos del grupo de animales curados con OLEOZON. Al respecto se debe significar que en humanos, ha sido establecido que cortos períodos de exposición al ozono por vía inhalatoria producen aumento de las células y los mediadores de la inflamación, junto a otros efectos biológicos<sup>12-14</sup> y que en los fluidos obtenidos mediante lavado broncoalveolar en humanos expuestos al ozono por vía respiratorio muestran un incremento en el infiltrado de neutrófilos.<sup>12</sup> Junto a ello, se ha reportado que el daño que causa el gas cuando es inhalado, está relacionado con la liberación del ácido araquidónico de la membrana celular, lo que condiciona una elevación en los leucotrienos que son iniciadores de la quimiotaxis, razón por la cual, los neutrófilos son atraídos hacia el tejido pulmonar.<sup>15</sup> Los mecanismos de acción del aceite ozonizado son diferentes a los del ozono inhalado. Además, se ha demostrado la inocuidad del OLEOZON en ensayos preclínicos de irritabilidad dérmica y oftálmica, estudios de toxicidad aguda y ensayos de mutagenicidad y teratogenicidad.

dad.<sup>16-18</sup> A pesar de ello, es necesaria su utilización en dosis adecuadas y controladas<sup>5,6</sup> y por vías no dañinas al organismo, pues de esta forma, no se producen reacciones adversas,<sup>19</sup> ni daño genotóxico<sup>20</sup> y se pueden obtener efectos beneficiosos, como es el caso aquí estudiado sobre el proceso de cicatrización.

Los hallazgos histológicos, unido a lo observado en las mediciones realizadas en las heridas, hablan a favor de una acción estimuladora del OLEOZON sobre el proceso de fibroplasia, es decir que su fundamental efecto en la cicatrización (además de lo ya referido sobre la etapa inflamatoria) ocurre sobre el tejido conectivo y sus componentes, aspecto que requiere ser estudiado con mayor profundidad.

## CONCLUSIONES

El OLEOZON no modifica la secuencia general de los fenómenos que se producen durante la cicatrización de dichas lesiones.

Se demostró que el OLEOZON tiene una acción favorecedora de la cicatrización.

## BIBLIOGRAFIA

1. Rilling S.H. 30 years of ozone/oxygen therapy: A historical perspective. Proceedings of the Eleventh Oxone World Congress (San Francisco, USA). Ozone in Medicine, M-1-3, 1993.
2. Bocci V. Ozone Therapy today. Proceedings of the 12th Ozone World Congress (Lille, France). Ozone in Medicine, 13, 1995.
3. Gabarielson E.W., Yu X. and Spannhake W.E. Comparison of the toxic effects of hydrogen peroxide and ozone on cultured human bronchial epithelial cells. *Env. Health Persp.*, **102**, 972, Nov., 1994.
4. Pryor W. A. and Uppu R.M. A kinetic model for the competitive reactions of ozone with amino acid residues in proteins in reverse micelles. *The J. of Biol. Chem.*, **268**, 3120, Feb. 1993.
5. Viebahn R. The biochemical process underlying ozone therapy. *OzoNachrichten*, Heft 1/2, 18, 1985.
6. Basabe E., Menéndez S., Segarra F. and Ponce de León M. Ozone therapy like a favoring element in the rehabilitation of children with hearing loss. Proceedings of the 12th Ozone World Congress. (Lille, France), Ozone in Medicine, 275, 1995.
7. León O.S., Menéndez S., Merino N., Castillo R., Sam S. and Pérez L. Ozone oxidative preconditioning: A protection against cellular damage by free radicals. Proceedings of the 13th Ozone World Congress, 2, 707, 1997.
8. De las Cagigas T., Bastard V., Menéndez S., Gómez M. y Eng L. El aceite ozonizado en infecciones de la piel y su aplicación en el Consultorio

- del Médico de la Familia. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **20**, 81, 1989.
9. Grillo R., Falcón L., Lorenzo W., Daniel R., Menéndez S., Gómez M., Fernández L. A. Tratamiento de la onicomiosis con aceite ozonizado. Primer Congreso Iberoamericano de Aplicaciones del Ozono. Centro Nacional de Investigaciones Científicas-Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas. 31 de octubre de 1990.
  10. Grillo R., Falcón L., Menéndez S. y Simón R.D. Tratamiento del Herpes Simple Genital con aceite ozonizado. Estudio preliminar. **Medicina Militar**, **4**, 59, 1990.
  11. Mena L., Menéndez S., Omechevarría E. Efectos del ozono en el tratamiento de la gingivoestomatitis herpética aguda. **Rev. Cubana de Estomatol.**, **31**, 14, enero-junio, 1994.
  12. McBride D.E., Koenig J.Q. *et al.* Inflammatory effects of ozone in the upper airways of subjects with asthma. **Am J. Respir. Crit. Care Med.**, **149**, 1192, 1994.
  13. Morton L. Use of human lung tissue for studies of structural changes associated with chronic ozone exposure: Opportunities and critical issues. **Environ. Health Persp. Supp.**, **102** (Suppl. e), 208, Dic., 1993.
  14. Madden M.C., Eling T.E., Dailey L. A. and Friedman M. The effect of ozone exposure on rat alveolar macrophage arachidonic acid metabolism. **Exp. Lung Res.** **17**, 47, 1991.
  15. Doellman C.J.A. Reactive oxygen species and airway. Ed. Febodruk, Amsterdam, 7-15, 1991.
  16. Martínez G. *et al.* Estudio de la toxicidad aguda dérmica del aceite ozonizado "OLEOZON" en ratas. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **28**, 35, 1997.
  17. Fernández I., Menéndez S., Gómez M. Evaluación mutágena del aceite ozonizado administrado intragás-tricamente. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **20**, 14, 1989.
  18. Rodríguez M.D., Menéndez S., Gómez M., García H., Eng L. Estudio teratogénico del aceite ozonizado. I Congreso Iberoamericano de Aplicaciones del Ozono. Centro Nacional de Investigaciones Científicas-Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas. 31 de octubre de 1990.
  19. Jacobs M.T. Zwischenfalle and typische Komplikationen in der Ozon-sauerstoff-therapie. Atti Congresso sull' ozono. 5-6, 11. Baden-Baden, 1981.
  20. Remigio A., González Y., Zamora Z. OLEOZON (ozonized sunflower oil) genotoxic evaluation using micronucleus assays in bone marrow and peripheral blood of mice. 2nd International Symposium on Ozone Applications. Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, March, 1997.